

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experimental* dengan rancangan *post test only control group design*. Metode yang digunakan adalah *tube dilution test* untuk mengetahui pengaruh ekstrak kulit semangka (*Citrullus lanatus*) sebagai antijamur dengan berbagai konsentrasi terhadap jamur *C. albicans* secara *in vitro*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang dengan estimasi waktu selama 14 hari.

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur *C. albicans* yang diperoleh dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang yang disesuaikan dengan standar Mc Farland (10^8 CFU/ml).

4.3.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah *C. albicans* yang telah dibiakkan dan telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C , diambil dengan menggunakan *simple random sampling*.

4.3.3 Estimasi dan Jumlah Pengulangan

Penelitian menggunakan 9 kelompok perlakuan ekstrak kulit semangka dan 2 kelompok kontrol, sehingga ada 11 kelompok. Berdasarkan rumus *Resource Equation Approach* (2017) dengan k adalah jumlah kelompok dan n adalah jumlah pengulangan, maka:

$$10 - 20 = kn - k$$

minimum

$$10 = k(n - 1)$$

$$n = \left(\frac{10}{k}\right) + 1$$

$$n = \left(\frac{10}{11}\right) + 1$$

$$n = 0.909 + 1$$

$$n = 1.909 \approx 2$$

maksimum

$$20 = k(n - 1)$$

$$n = \left(\frac{20}{k}\right) + 1$$

$$n = \left(\frac{20}{11}\right) + 1$$

$$n = 1.818 + 1$$

$$n = 2.818 \approx 3$$

Keterangan :

k = jumlah kelompok total

n = jumlah pengulangan tiap kelompok

Dari hasil perhitungan diatas, maka diperlukan tiga kali pengulangan untuk sampel (Arifin dan Zahiruddin, 2017).

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit semangka dalam konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 0%.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah koloni jamur *C. albicans* yang dapat dilihat dari KBM.

4.4.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah kontrol kuman (+) dan kontrol bahan (-)

4.5 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Cara Pengukuran	Indikator penilaian	Skala
Variabel Bebas					
1.	Ekstrak kulit semangka (<i>Citrullus lanatus</i>)	Ekstrak kulit semangka adalah ekstrak yang berasal dari kulit dari semangka yang dikeringkan kemudian diekstraksi dan dimaserasi dengan larutan aquabides dan diambil filtratnya dengan penyaring kemudian diuapkan dalam <i>rotary evaporator</i> sehingga menghasilkan ekstrak kulit semangka.	Ekstrak kulit semangka diukur menggunakan mikropipet sesuai dengan konsentrasi pada setiap tabung	Konsentrasi: 1. 10 % 2. 20 %, 3. 30 %, 4. 40 %, 5. 50 %, 6. 60 %, 7. 70 %, 8. 80 %, 9. 90 %, 10. 100%.	Ordinal
Variabel Tergantung					
2.	Pertumbuhan <i>C. albicans</i>	Pertumbuhan jamur yang dilihat dengan menghitung jumlah koloni pada <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (SDA)	Penghitungan dengan <i>Colony Counter</i>	Jumlah koloni pada <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (SDA)	Rasio
3.	KBM (Kadar Bunuh Minimum)	Kadar terkecil ekstrak kulit semangka (<i>Citrullus lanatus</i>) yang mampu membunuh pertumbuhan jamur 99,9% dari inokulum.	Penghitungan dengan <i>Colony Counter</i>	Tidak ada pertumbuhan jamur pada <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (SDA)	Rasio

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Kulit Semangka (*Citrullus lanatus*)

1. Alat

- Blender
- Penyaring *Buchner*
- Tabung ekstraktor
- Labu erlenmeyer
- *Shake waterbath*
- *Rotary Vacum Evaporator*
- Neraca Analitik
- Corong gelas
- *Beaker glass*

2. Bahan

- Kulit semangka
- Aquabides
- Aquades

4.6.2 Alat dan Bahan Uji Antimikroba

1. Alat

- Tabung raksi steril
- Ose lengkung
- Mikropipet 1 ml
- Inkubator
- Lampu spirtus
- Label

- *Vortex*
- *Colony counter*

2. Bahan

- Perbenihan cair jamur *C. albicans*
- Ekstrak kulit semangka
- Aquades
- *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB)
- *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan cara:

1. Mencuci semua peralatan dengan sabun hingga bersih dan membiarkannya hingga kering.
2. Alat-alat yang dapat disterilkan dalam *autoklaf* dibungkus dengan kertas sampul dan dimasukkan dalam *autoklaf* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 atm selama 15 menit. Sedang alat yang tidak dapat disterilkan dengan *autoklaf* disterilkan dengan alkohol 70%.

4.7.2 Pembuatan Medium *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)

1. Menimbang SDA sebanyak kebutuhan, lalu tambahkan aquades sesuai kebutuhan.
2. SDA direbus lalu disterilisasi dalam *autoklaf* pada tekanan 15 atm pada suhu 121°C selama 15 menit.
3. SDA yang telah disterilisasi dituangkan ke dalam masing-masing cawan petri sebanyak 20 ml.

4.7.3 Pembuatan *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB)

1. Timbang bahan sebanyak kebutuhan, lalu tambahkan aquades sesuai kebutuhan dan diaduk secara merata.
2. SDB direbus sampai tercampur rata.
3. SDB yang sudah direbus disterilisasi dalam *autoklaf* pada tekanan 15 atm pada suhu 121⁰C selama 15 menit.
4. SDB yang telah disterilisasi dituangkan ke dalam masing-masing tabung.

4.7.4 Pembuatan Ekstrak Kulit Semangka (*Citrullus lanatus*)

1. Keringkan kulit semangka yang sudah dibersihkan dan dipotong-potong dengan menggunakan oven pada suhu 40⁰C selama 24 jam.
2. Sampel diblender kemudian disaring menggunakan saringan 100 mesh hingga didapatkan serbuk halus.
3. Bubuk kulit semangka ditimbang dengan menggunakan timbangan sebanyak 300 gram kemudian dimasukkan dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter dan ditambahkan aquabides panas dengan suhu 90⁰ sampai volume 900 ml.
3. Larutan tersebut dihomogenkan dengan shaker dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruangan selama 24 jam.
4. Ekstrak disaring menggunakan kertas saring dan disterilkan menggunakan membran filter 45 µm.
5. Filtrat yang diperoleh diuapkan dengan tekanan rendah pada suhu 60⁰C menggunakan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 100%.

4.7.5 Identifikasi Jamur *Candida albicans*

a. Pemeriksaan secara makroskopis

Pemeriksaan ini dilakukan dengan mengamati koloni *C. albicans* yang berupa koloni halus berwarna putih kekuningan dan berbau ragi.

b. Pemeriksaan secara mikroskopis

1. Ambil pembenihan *C. albicans* dengan ose dan letakan pada objek glass.
2. Tetesi larutan KOH pada objek glass lalu tutup dengan cover glass.
3. Panaskan sebentar pada api, kemudian lihat di bawah mikroskop.
4. Carilah bentukan khas *C. albicans* yaitu bentuk sel yeast dengan *pseudohypha*.

4.7.6 Pembuatan Perbenihan Cair Jamur

1. Ambil 1 ose koloni jamur dari media subculture, kemudian suspensikan ke dalam SDB di dalam tabung.
2. Tabung kemudian divortex dan disesuaikan dengan standard McFarland 1×10^8 CFU/ml.

4.7.7 Uji Efektifitas Kepekaan Ekstrak Kulit Semangka terhadap Jamur *C. albicans*

Metode yang digunakan adalah metode dilusi. Pada penelitian ini diperlukan kadar beberapa konsentrasi ekstrak kulit semangka untuk dicampurkan atau diinokulasi dengan perbenihan cair jamur *C. albicans*. Proses selanjutnya ialah mengeringkan selama 24 jam pada suhu 37°C dengan cara sebagai berikut :

Hari ke-1 :

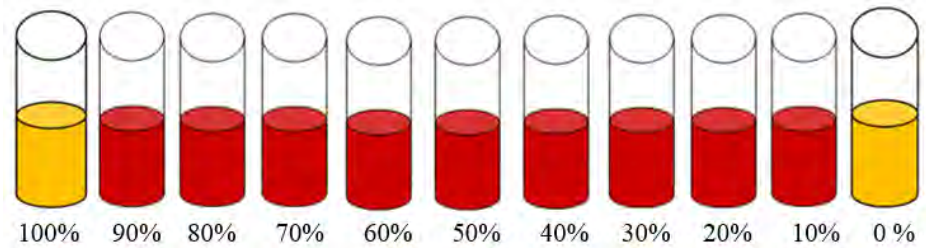
- a. Sediakan 11 tabung reaksi steril; tabung 1, tabung 2, tabung 3, tabung 4, tabung 5, tabung 6, tabung 7, tabung 8, tabung 9, tabung 10, tabung 11.
- b. Masukkan ekstrak, perbenihan jamur, dan *aquades* dengan perbandingan sebagai berikut:

Konsentrasi	Ekstrak (μ l)	Perbenihan (μ l)	<i>Aquades</i> (μ l)
100 % (KK+)	1000	0	0
90 %	900	100	0
80 %	800	100	100
70 %	700	100	200
60 %	600	100	300
50 %	500	100	400
40 %	400	100	500
30 %	300	100	600
20 %	200	100	700
10 %	100	100	800
0 % (KK-)	0	100	900

Keterangan:

- KK+ = Kontrol kuman positif
- KK- = Kontrol kuman negatif

- c. Dengan demikian, volume masing-masing tabung menjadi 1 ml sehingga konsentrasi akhir menjadi seperti berikut.



- d. Kemudian masing-masing tabung divortex lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

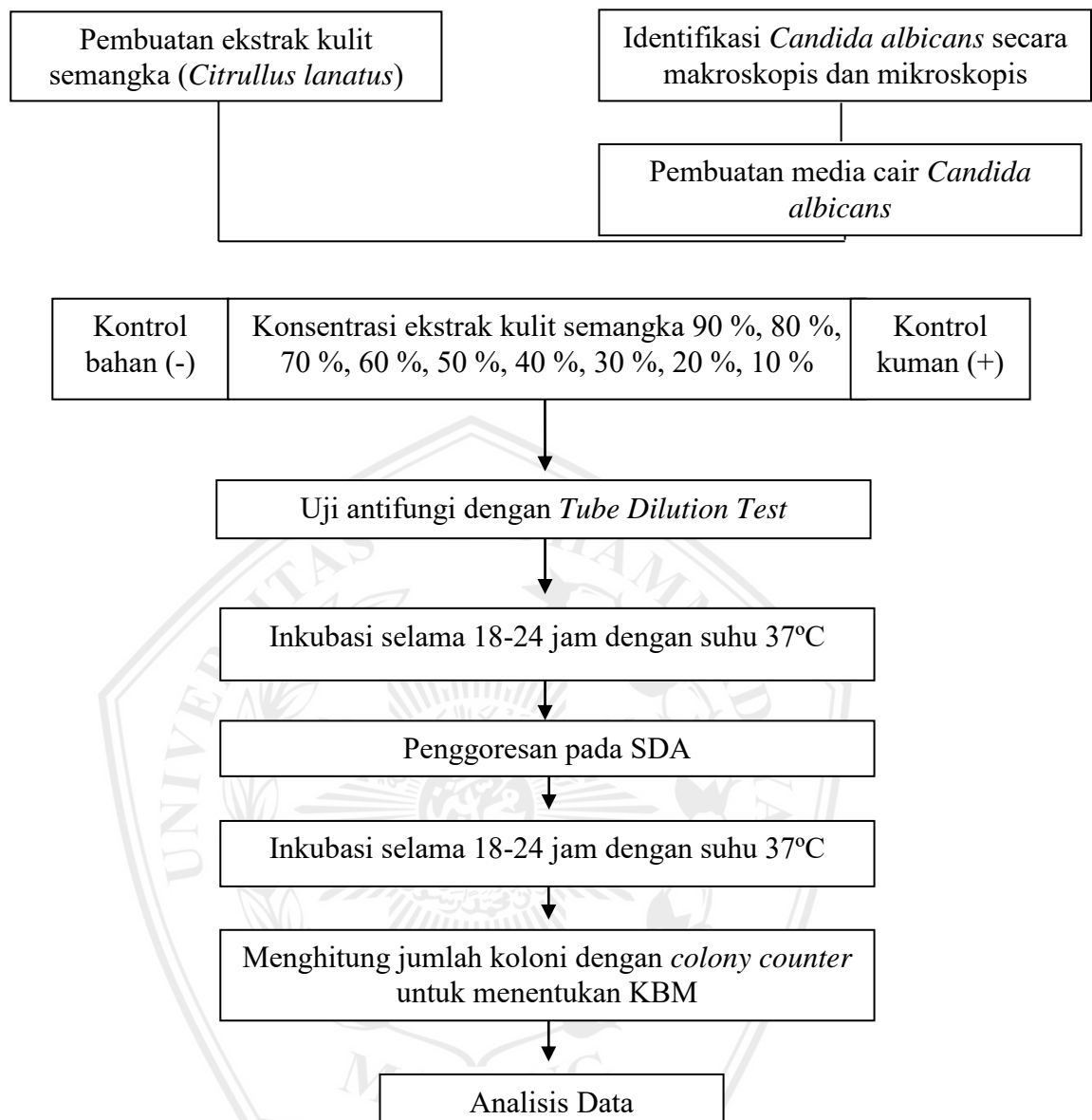
Hari ke 2 :

Pada hari ke-2 tabung dikeluarkan dari inkubator. Kemudian dari masing-masing tabung diambil 1 ose dan diinokulasikan pada SDA. Lalu diinkubasikan lagi 18-24 jam pada suhu 37°C

Hari ke-3 :

Pada hari ke-3 SDA dikeluarkan dari inkubator kemudian dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni jamur dengan *colony counter* sehingga didapatkan data KBM.

4.8 Skema Alur Penelitian



4.9 Analisis Data

Analisis yang digunakan untuk mengetahui KBM adalah jenis analisis deskriptif. Analisis data dimulai dengan uji parametrik, yaitu uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-wilk* karena jumlah sampel yang digunakan kurang dari 50 dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene*.

Apabila data terdistribusi normal dan varian data sama, maka dilanjutkan dengan uji *one way* ANOVA. Uji ini digunakan untuk membuktikan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan.

Apabila data terdistribusi tidak normal dan varian data tidak sama, maka menggunakan uji *Kruskal-wallis*.

Untuk mengetahui perbedaan yang bermakna antara masing-masing kelompok dilakukan uji *Post-Hoc Bonferroni* apabila sampel homogen. Apabila sampel tidak homogen menggunakan uji *Post-Hoc Tamhane*.